Journal of Plant Protection
Vol. 34, No. 1, Spring 2020, P. 1-13

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹، ص. ۱۳-۱

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی نسبی تولید آنزیم لیپاز و کیتیناز قارچ‌های جدا شده از نماتد سیستی چغندرقند در شرایط آزمایشگاهی

اعظم سلیمانی[1]- عصمت مهدیخانی مقدم[2]*- حمید روحانی[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۰۸

چکیده

در این تحقیق فعالیت آنزیمی لیپاز و کیتیناز قارچ‌های همراه نماتد سیستی چغندرقند (*Heterodera schachtii*) جمع‌آوری شده از استان خراسان رضوی مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور در سال زراعی ۹۵-۹۴، حدود ۳۰۰ جدایه قارچی از سیست، ماده و تخم و لارو نماتد سیستی چغندرقند جداسازی گردید. جدایه‌های مذکور پس از خالص‌سازی، مورد بررسی‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و مولکولی قرار گرفتند و با استفاده از کلیدهای معتبر شناسایی شدند. از میان آن‌ها شش گونه شامل *Simplicillium lanosoniveum*، *Penicillium chrysogenum*، *Colletotrichum gloeosporioides*، *Neonectria macrodidyma*، *Fusarium oxysporum* و *Alternaria chlamydospora* شناسایی شدند. در بررسی نسبی فعالیت آنزیم لیپاز، قارچ *C. gloeosporioides* بیشترین میزان تولید این آنزیم را نشان داد و در بررسی نسبی فعالیت کیتیناز، بیشترین تولید این آنزیم مربوط به قارچ *P. chrysogenum* بود.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، قارچ، کیتیناز، لیپاز، نماتد سیستی

مقدمه

در جهان امروز یکی از مشکلات اساسی بشر تأمین نیازهای غذایی است، کشاورزی به دلیل داشتن نقش حیاتی در تأمین غذای مورد نیاز جامعه، یکی از مهم‌ترین بخش‌های اقتصادی کشور محسوب می‌شود. حدود ۳۰ درصد شکر مورد نیاز جهان، توسط زراعت چغندرقند و مابقی آن از نیشکر تأمین می‌گردد (۳۲). چغندرقند با نام علمی *Beta vulgaris* گیاهی دوساله از تیره Chenopodiaceae می‌باشد. ریشه این گیاه طی سال اول متورم شده و در آن ساکارز تجمع می‌نماید (۲ و ۲۶). چغندرقند از گیاهان مهمی است که در بیشتر استان‌های کشور به‌ویژه استان خراسان رضوی کشت می‌شود. سطح کشت چغندرقند در سال زراعی ۹۴-۹۳ در کشور در حدود ۱۰۵ هزار هکتار برآورد شده که استان خراسان رضوی با حدود ۱۹ هزار هکتار بیشترین سطح کشت را به خود اختصاص داده است (۳۲). چغندرقند یکی از محصولات ارزشمند کشاورزی، به لحاظ صنعتی و اشتغال‌زایی برای کشور محسوب می‌شود. بااین‌وجود تولید این محصول با چالش‌های فراوانی ازجمله تعداد نسبتاً زیاد آفات و بیماری‌ها روبرو است. نماتدهای انگل گیاهی از این عوامل بیماری‌زا هستند، که بیشتر از ریشه گیاهان تغذیه می‌کنند، در خاک و بافت گیاهان یافت می‌شوند و گونه‌های متعددی ممکن است در یک مزرعه وجود داشته‌باشند. نماتدهای سیستی باعث بروز خسارت‌های زیادی به محصولات کشاورزی می‌شوند و دارای اهمیت اقتصادی بسیار بالایی در کشورهای مختلف دنیا می‌باشند. در میان جنس‌های مختلف نماتدهای سیستی، دو جنس *Heterodera* و *Globodera*، بیشتر متداول بوده و از لحاظ ایجاد خسارت اقتصادی به محصولات اهمیت زیادی دارند (۱۰). در دنیا بیش از ۶۰ گونه نماتد انگل گیاهی در مزارع چغندرقند مشاهده و شناسایی شده‌اند که سالانه حدود ۱۱٪ محصول چغندر را کاهش می‌دهند و ۹۰٪ این خسارت را تنها به نماتد سیستی چغندرقند (*H. schachtii*) نسبت می‌دهند (۳۱). در ایران تاکنون از خاک مزارع چغندرقند نماتدهای مختلفی جداسازی و گزارش شده است. نماتد سیستی چغندرقند *H. schachtii* به دلیل گستردگی، آلودگی بالا و خسارت شدید به محصول چغندرقند در استان‌های اصفهان، خراسان، آذربایجان غربی و فارس تحقیقات بیشتری را به خود اختصاص داده است (۲ و ۲۶).

روش‌های مختلفی برای مدیریت این نماتدها پیشنهاد شده است.

۱، ۲ و۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و استادان گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: Mahdikhani-e@um.ac.ir)

علی‌رغم استفاده از نماتدکش‌ها، جمعیت نماتدها بعد از مدتی دوباره افزایش می‌یابد. تولید ارقام مقاوم در برابر نماتدهای سیستی کار بسیار مشکلی است (۲ و ۲۶). از طرف دیگر، به دلیل فشارهای اقتصادی، استفاده از تناوب زراعی در حد محدودی توسط کشاورزان انجام می شود. بر این اساس کنترل بیولوژیکی با کاربرد قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست به‌عنوان یک پدیده و روشی جدید با دورنمایی جذاب و جالب از خود موجب جلب افکار عمومی شده است (۲۵) و همچنین به عنوان یکی از راهکارهای مدیریتی همراه با دیگر روش‌ها برای مدیریت نماتدهای انگل گیاهی، موردتوجه قرارگرفته است (۱۸ و ۳۶). دشمنان طبیعی زیادی (بیمارگرها، شکارچیان، رقابت کنندگان و آنتاگونیست‌ها) وجود دارند که به نماتدهای انگل گیاهی، در خاک حمله کرده و جمعیت آن‌ها را کاهش می‌دهند، قارچ‌ها حدود ۷۶٪ این دشمنان را تشکیل می‌دهند (۶).

با توجه به ترکیبات دیواره پوست تخم نماتدها که دارای مقادیر بالای کیتین، چربی و پروتئین می‌باشد (۵) و توانایی قارچ‌های پارازیت کننده نماتدها در سنتز آنزیم‌های کیتیناز، لیپاز و پروتئاز، استفاده از این قارچ‌ها جهت کنترل بیولوژیک با نماتدهای سیستی می‌تواند یک راهکار موفق جهت کاهش مصرف سموم و جلوگیری از آلودگی محیط زیست شود (۸). آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی که توسط عوامل بیوکنترل قارچی تولید می‌شوند در کنترل بیولوژیک مهم هستند.

نبی خضری‌نژاد و همکاران طی سال‌های ۸۲ تا ۸۳ قارچ‌های همراه با نماتد سیستی چغندرقند در مزارع استان آذربایجان غربی را مورد بررسی قراردادند و حدود ۳۰۰ جدایه قارچی از روی آن‌ها جدا شد و مورد مطالعه تاکسونومیکی قرار گرفت که تعداد ۱۶ گونه متعلق به نه جنس معرفی کردند (۲۱).

همچنین خضری‌نژاد و همکاران در بررسی دیگر حدود ۴۰۰ جدایه قارچی از مراحل مختلف نماتد سیستی چغندرقند جداسازی و از نظر تاکسونومیکی مورد مطالعه قراردادند. تعداد ۱۲ گونه از ۱۱ جنس شامل *Alternaria alternata*، *A. malorum*، *Arthrinium phaeospermum*، *Arthrobotrys oligospora*، *Botryotrichum piluliferum*، *Chaetomium spirolotrichum*، *Cladosporium oxysporum*، *Cylindrocarpon destructans*، *Embellisia chlamydospora*، *Geomyces pannorum*، *Stemphylium botrysom* و *Ulocladium atrum* در این مقاله معرفی شدند (۲۲).

مهدیخانی‌مقدم و همکاران اثر ۱۰ جدایه از قارچ *Trichoderma harzianum* و *T. virens* را در آزمایشگاه و گلخانه روی تخم و سیست نماتد سیستی چغندرقند موردبررسی قرار دادند. جدایه‌های قارچ تریکودرما در آزمایشگاه به‌طور متوسط ۶۰ درصد تخم‌های نماتد را در مقایسه با شاهد انگلی کردند و از بین بردند. در بین آن‌ها دو جدایه *T. harzianum Bi* و *T. virens VM1* به ترتیب با ۷۶/۱۸ و ۷۲/۵۵ درصد پارازیتیسم، بهتر از جدایه‌های دیگر عمل کردند (۲۴).

تحقیقات نشان می‌دهد که آنزیم‌های خارج سلولی مانند بتا یک و سه گلوکاناز، سلولاز و کیتیناز به‌وسیله عوامل بیوکنترل قارچی تولید می‌شوند (۴). از به‌ورزی ژنتیکی در فعالیت این مایکوپارازیت‌ها برای تولید جهش‌یافته‌هایی باقدرت چندین برابر در تولید این آنزیم‌ها و جهش‌یافته‌هایی فاقد آن و تولید گیاهان ترانس‌ژنیک بیان کننده این آنزیم‌ها، نقش تولید آن‌ها در پدیده بیوکنترل مورد تائید قرار گرفته است. در تحقیقات گذشته توانایی تولید این آنزیم‌ها به‌وسیله قارچ‌های آنتاگونیست مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته شده است. در این بین کیتینازها بیشترین توجه را به خود اختصاص داده‌اند (۱۹).

سیستم تجزیه کیتین قارچ‌های آنتاگونیست شامل آنزیم‌های زیادی می‌باشد و لیست ترکیبات آن هر روزه به‌عنوان آنزیم‌ها و ژن های کد کننده جدید گزارش می‌شود. کیتینازها به یک و چهاربتا استیل گلوکزامینیدازها، اندوکیتینازها و اگزوکیتینازها تقسیم می‌شود (۱۳). دیواره سلولی قارچ‌های عامل بیماری‌زا و کیتین، ژن عامل بیان کیتیناز را تحریک می‌کند؛ اما تنها زمانی فعال می‌شود که با عامل بیماری‌زا تماس برقرار شود (۱۳ و ۱۵).

قارچ‌ها به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان میکروارگانیسم‌های تولید کننده آنزیم لیپاز مورد استفاده قرار می‌گیرند. لیپازها به‌عنوان استرگلیسرول هیدرولازها معرفی می‌شوند و در واقع می‌توان آن را یک استراز دانست زیرا در اثر فعالیت خود قادر است گلیسیریدها را به گلیسیرین و اسیدهای چرب تجزیه نماید. سرعت این واکنش و تبدیل چربی به گلیسیرین و اسیدهای چرب بستگی به طول زنجیره‌های اسیدچرب، pH محیط و حرارت دارد (۱۴).

هدف از این تحقیق، علاوه بر شناسایی قارچ‌های همراه نماتد سیستی چغندر قند در منطقه مورد مطالعه، بررسی میزان فعالیت نسبی آنزیم‌های کیتیناز و لیپاز این قارچ‌ها بوده است.

مواد و روش‌ها

در طی سال زراعی ۹۵-۹۴، تعداد ۲۲ نمونه خاک، ریشه و غده چغندرقند از مزارع آلوده به نماتد سیستی چغندرقند استان خراسان رضوی جمع‌آوری گردید. جهت استخراج نماتدهای سیستی از خاک از روش فنویک (فنویک، ۱۹۴۰) استفاده شد (۱۱). ماده‌های سفید رنگ نیز با سوزن ظریف از روی ریشه برداشته شد و بعد از شستشو، در آب مقطر استریل قرار داده شدند. سیست‌ها و ماده‌های جدا شده، چندین بار در آب مقطر شستشو و با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد، الکل‌اتیلیک ۱۰ درصد و ۲۰ درصد به مدت دو یا سه دقیقه استریل گردیدند. سیست‌ها و ماده‌ها مجدداً با آب مقطر استریل شستشو و روی کاغذ صافی استریل آبگیری شدند. سیست‌ها و ماده‌ها در تشک

پتری حاوی محیط کشت MEA[1]، CMA[2]، PDA[3] و PCA[4] در زیر هود لامینار توسط سوزن به طور جداگانه برداشته و کشت گردیدند. چهار عدد سیست در چهار طرف هر تشک پتری هشت سانتی‌متری حاوی محیط‌های فوق قرار داده شد. ۱۶ سیست قهوه‌ای رنگ از هر نمونه خاک کشت داده شد. دو تشک پتری از هر نمونه در دو دمای مختلف گرم و سرد، انکوباتور با دمای ۲۵–۲۰ درجه سانتی‌گراد و در انکوباتور با دمای ۱۰–۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری و به طور مرتب مورد بازرسی قرار گرفتند. بعد از ۷ تا ۱۴ روز قارچ‌های رشد کرده از آن‌ها به محیط کشت جدید PDA جهت رشد بهتر منتقل و در مراحل بعد با روش تک اسپور و یا نوک ریسه روی محیط کشت WA[5] دو درصد خالص‌سازی شدند. قارچ‌های خالص شده در لوله‌های آزمایش حاوی محیط غذایی PCA و دمای چهار درجه سانتی‌گراد (۲۸) و همچنین روی محیط ماسه جهت مطالعات بعدی نگهداری شدند (۱۷).

پوسته سیست‌ها به‌وسیله سیست خردکن (هموژنایزر) تخریب و تخم‌ها و لاروهای داخل آن آزاد گردید. تخم‌های آزاد شده از سیست ها داخل آب مقطر استریل به‌صورت سوسپانسیون درآمدند. مقدار نیم تا یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون تخم و لارو توسط پیپت استریل برداشته و در سطح تشک پتری حاوی محیط کشت WA دو درصد پخش گردید. این محیط‌های کشت نیز در انکوباتور با دمای ۲۵–۲۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگهداری شده و به طور مرتب مورد بررسی قرار گرفتند. قارچ‌های رشد کرده از این تخم و لاروها به محیط کشت جدید منتقل و با روش تک اسپور و یا نوک ریسه خالص‌سازی شدند (۲۰). جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها در سه بخش جداسازی از سیست‌ها و ماده‌ها، جداسازی از تخم‌ها و جداسازی از لاروهای سن دوم انجام شد و خالص‌سازی قارچ‌های مذکور به روش تک اسپور صورت پذیرفت.

جهت شناسایی جدایه‌های قارچی به‌دست‌آمده از دو روش شناسایی مورفولوژیکی و شناسایی مولکولی (روش‌های مبتنی بر PCR[6] (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز)) استفاده شد. شناسایی مولکولی با تعیین توالی ناحیه ITS صورت گرفت. برای این منظور میسلیوم قارچی آماده‌سازی شد، سپس استخراج DNA ژنومی به دو روش استفاده از بافر استخراج CTAB و کیت استخراج DNA ژنومی انجام شد. پس از استخراج DNA ژنومی، واکنش PCR جهت تکثیر ژنوم استخراج شده انجام گرفت که با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4، نواحی از DNA ریبوزومی تکثیر و قطعات DNA به طول ۵۵۰ تا ۶۵۰ جفت باز به‌دست آمد. بعد از انجام واکنش PCR، جهت تأیید انجام شدن واکنش و تعیین اندازه DNA محصول PCR، از هر نمونه مقدار سه میکرولیتر در ژل آگارز دو درصد و به مدت ۳۰ دقیقه در ولتاژ ۸۵ ولت تفکیک شد. سپس از ژل در زیر نور UV با استفاده از دستگاه Gel Documentation عکس گرفته شد. اندازه به دست آمده در مقایسه با یک نشانگر جرم مولکولی DNA، ۱۰۰۰ جفت بازی تخمین زده شد.

بررسی فعالیت آنزیم لیپاز

به منظور القای تولید آنزیم لیپاز توسط جدایه‌های قارچی، از محیط کشت پپتون–آگار استفاده شد. محیط پپتون–آگار شامل ۱۰ گرم پپتون، پنج گرم NaCl آزمایشگاهی، ۰/۱ گرم $CaCl_2 2H_2O$، ۱۶ گرم آگار، در یک لیتر آب مقطر حل شده بود که pH آن روی شش تنظیم شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر توئین به محیط اضافه گردید. بعد از اتوکلاو محیط کشت در تشک‌های پتری ۱۰ سانتی‌متری ریخته شد. بعد از یک روز یک دیسک پنج میلی‌متری از هر جدایه در وسط تشک پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد و به مدت پنج تا هفت روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تشکیل رسوب در اطراف پرگنه‌های رشد کرده به منزله تولید آنزیم لیپاز در نظر گرفته شد (۳۳).

بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز

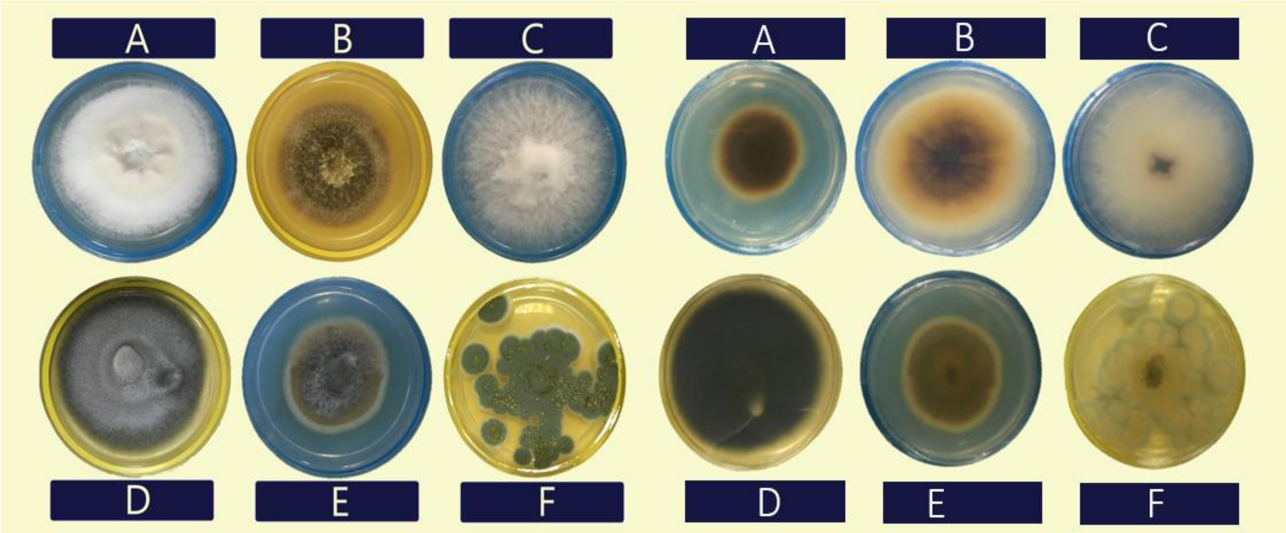
به منظور تهیه محیط کشت القاکننده کیتیناز و بررسی تولید این آنزیم توسط جدایه‌های قارچی، محیط کشت شامل ۴/۵ گرم کلوئیدال کیتین (به عنوان منبع کربن) (۳۵)، ۰/۳ گرم سولفات منیزیم، سه گرم سولفات آمونیوم، دو گرم فسفات دی هیدروژن پتاسیم، یک گرم اسیدسیتریک مونوهیدرات، ۱۵۴ گرم آگار، ۰/۱۵ گرم پودر رنگی بروموکرزول پرپول[7]، ۲۰۰ میکرولیتر توئین و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه گردید. اسیدیته محیط با استفاده از محلول ۴ نرمال KOH در ۴/۷ تنظیم گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد سترون گردید. بعد از آماده شدن محیط، مرکز تشک‌های پتری حاوی محیط کشت مذکور یک دیسک پنج میلی‌متری از هر کدام جدایه‌های قارچی قرار داده شد و به مدت سه تا چهار روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. تشکیل هاله بنفش رنگ اطراف پرگنه‌های رشد کرده و تغییر رنگ محیط کشت به رنگ بنفش به منزله تولید آنزیم کیتیناز در نظر گرفته شد (۱).

1- Malt Exteract Agar عصاره مالت–آگار
2- Corn Meal Agar ذرت–آگار
3- Potato Dextrose Agar سیب‌زمینی–دکستروز–آگار
4- Potato Carrot Agar سیب‌زمینی–هویج–آگار
5- Water Agar آب–آگار
6- polymerase chain reaction
7- Bromo Cresol Purple

جدول ۱- تعداد جدایه‌های قارچی به دست آمده از نماتد سیستی چغندرقند (*H. schachtii*)

Table 1- Number of fungal isolates obtained from Sugar Beet cyst nematode (*H. schachtii*)

ردیف Row	محل جمع‌آوری Collection area	تعداد نمونه Number of samples	تعداد کل جدای‌های قارچی Total number of fungal isolates	جنس جدایه‌ها Genus of isolates
1	مشهد –طرق Mashhad-Torogh	1	12	*Simplicillium*
2	چناران–اسکندر آباد Mashhad-Eskandarabad	1	9	*Fusarium* *Simplicillium*
3	چناران–سفیدجان Chenaran-Sefidabad	1	5	*Fusarium*
4	چناران—محمود آباد Chenaran-Mahmoodabad	1	8	*Fusarium*
5	فریمان–اسدیه Fariman-Asadiye	1	4	*Penicillium* *Fusarium*
6	فریمان–سفیدسنگ Fariman-Sefidsang	2	10	*Fusarium*
7	فریمان–کته شمشیر Fariman-Kateshamshir	2	6	*Fusarium*
8	فریمان Fariman	2	11	*Fusarium* *Simplicillium*
9	فریمان–رباط میان دشت Fariman-Miyandasht	1	13	*Fusarium* *Neonectria*
10	جلگه زاوه Jolgezave	1	8	*Penicillium* *Colletotrichum*
11	تربت جام–خلیل آباد Torbatjan-Khalilabad	1	8	*Penicillium*
12	قوچان Ghuchan	1	14	*Alternaria* *Penicillium* *Colletotrichum*
13	قوچان Ghuchan	1	8	*Fusarium*
14	سرخس Sarakhs	1	12	*Fusarium*
15	سرخس Sarakhs	1	9	*Alternaria*
16	تربت حیدریه Torbatheydariye	1	16	*Fusarium* *Neonectria*
17	تربت حیدریه Torbatheydariye	2	13	*Fusarium* *Alternaria*
18	تربت حیدریه Torbatheydariye	2	20	*Fusarium*
19	مشهد–مزارع دانشگاه Mashhad- University farms	1	12	*Simplicillium*
20	خواف Khaf	1	7	*Penicillium*
21	جوین Join	2	13	*Simplicillium*
22	نیشابور Neyshabur	1	14	*Penicillium*



شکل ۱- تصاویر پشت و روی قارچ‌های شناسایی شده (A: *S .lanosoniveum*، B: *N .macrodidyma*، C: *F* .oxysporum، D: *C .gloeosporioides*، E: *A .chlamydospora*، F: *P .chrysogenum*)

Figure 1- Images of identified fungi (A: *S .lanosoniveum*, B: *N .macrodidyma*, C: *F .oxysporum*, D: *C .gloeosporioides*, E: *A .chlamydospora*, F: *P .chrysogenum*)

نتایج

نمونه‌برداری از ۲۲ منطقه مختلف استان خراسان رضوی صورت گرفت که این نمونه‌برداری‌ها از مزارع چغندرقند دارای علائم خسارت نماتد سیستی چغندرقند شامل پژمردگی برگ‌ها، تنک شدن مزرعه و ریشه‌ریشی و دوشاخه بودن غده چغندرقند صورت گرفت. نتایج نمونه‌برداری و تعداد کل جدایه‌های قارچی به‌دست آمده از مزارع چغندرقند استان خراسان رضوی به تفکیک هر منطقه در جدول ۱ آورده شده است. بیشترین جدایه قارچی به شهرستان تربت حیدریه و کمترین جدایه قارچی به شهرستان خواف تعلق داشت.

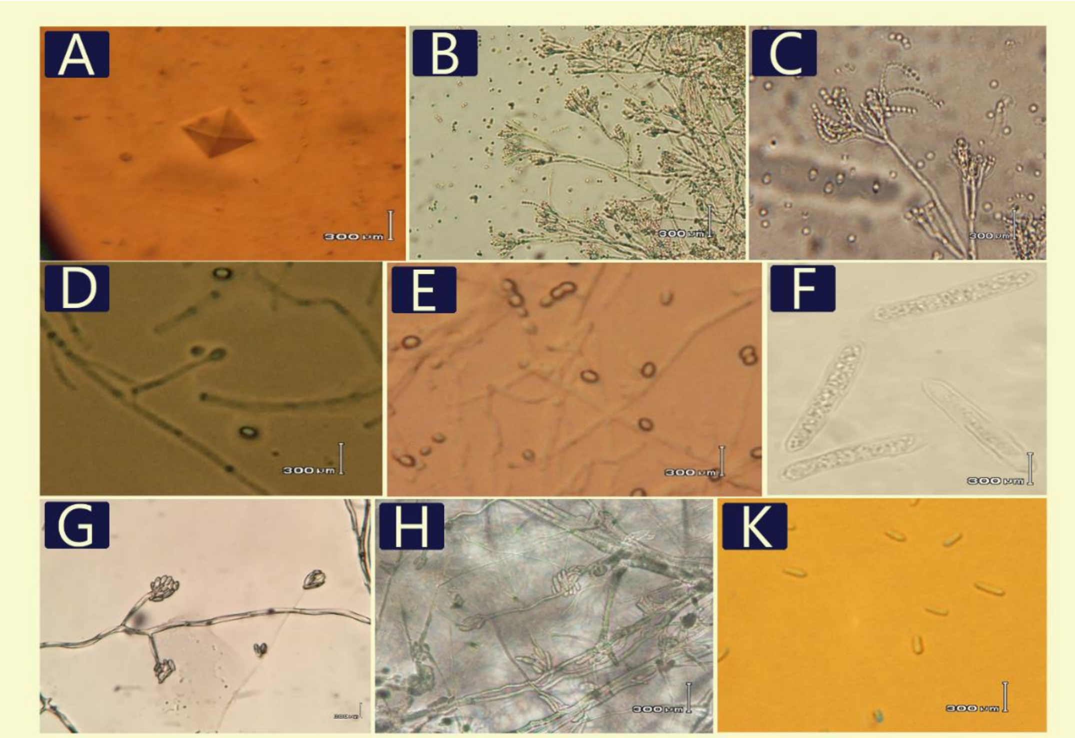
در این بررسی قارچ‌های (a) *Penicillium chrysogenum*، (b) *Simplicillium lanosoniveum*، *Fusarium oxysporum* (c)، (d) *Neonectria macrodidyma*، (e) *Colletotrichum gloeosporioides*، (f) *Alternaria chlamydospora* شناسایی شدند. تصاویر رو و پشت تشک پتری این قارچ‌ها در شکل ۱ آمده است.

در قارچ *P. chrysogenum* (کلید پیت، ۱۹۷۹ (۳۰)) میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پس از گذشت ۱۰ روز، ۴/۲-۲/۳ میلی‌متر بود. ریسه‌ها سبز رنگ، رنگ پرگنه سبزآبی تا سبز تیره و در اطراف دارای هاله سفیدرنگ و در سطح زیرین تشک پتری کرم تا زرد قهوه‌ای و یک حلقه سبز و در انتهای پرگنه سفید دیده شد. رشد به‌صورت پراکنده و روی پرگنه قطرات ریز زردرنگ دیده شد. کنیدیوفور منشعب و دارای متولا که روی هر متولا یک یا چند استریگما یا فیالید استوانه‌ای وجود داشت و روی هر فیالید یک ردیف کنیدی کروی شکل با دیواره صاف وجود داشت. کنیدیوم ها سبز رنگ، کروی تا تخم‌مرغی شکل با سطحی صاف بود. این قارچ متابولیت‌های راکفورتین C و D، کریسوژین و پنیسیلین F و G تولید می‌کند (۱۲). از این قارچ به عنوان بازدارنده از رشد عامل بیماری لکه شکلاتی باقلا در شرایط آزمایشگاهی و کاهنده شدت بیماری در شرایط گلخانه گزارش شده است (۱۶). در قارچ *Simplicillium lanosoniveum* (نوناکا و همکاران، ۲۰۱۳ (۲۹)) نیز میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پس از گذشت ۱۰ روز ۳۰ میلی‌متر بود. ریسه‌ها سفید رنگ دیده شد. رنگ پرگنه سفید بود ولی در سطح زیرین تشک پتری نارنجی تا قهوه‌ای و در بخش مرکزی پررنگ‌تر بود و پرگنه به‌صورت فشرده و در اطراف آن یک حلقه سفید دیده شد. فیالیدها ساده و منفرد و یا اینکه دو فیالید نزدیک به هم روی کنیدیوفور ایجاد شده بود. کنیدیوم‌ها نیمه کروی، بیضوی تا استوانه‌ای نسبتاً کوتاه و کوچک بود. کنیدیوم‌ها در انتهای فیالیدها تشکیل شده بود. کریستال های هشت وجهی در داخل آگار تشکیل شده بود.

در قارچ *Fusarium oxysporum* (لسلی و سامرل، ۲۰۰۶ (۲۳)) میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد پس از گذشت ۱۰ روز، ۵۵ میلی‌متر بود. شکل ظاهری پرگنه بسیار متغیر بود. ریسه‌ها سفید رنگ دیده شد. رنگ پرگنه سفید و برفکی بوده و میسلیوم‌های هوایی فراوان تشکیل شده بود و در سطح زیرین تشک پتری سفید و در بخش مرکزی پررنگ‌تر و شیری رنگ بود. نحوه تشکیل میکروکنیدی به صورت مجتمع و یک یا دو سلولی و ماکروکنیدی‌ها قایقی شکل بوده و میکروکنیدی روی فیالیدهای

کوتاه تشکیل شده بود. فیالیدها به صورت انفرادی بوده و کلامیدوسپور در این گونه به فراوانی تولید شد. در قارچ *Alternaria chlamydospora* (موکاکا، ۱۹۷۳ (۲۷)) میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پس از گذشت ۱۰ روز، ۳۸ میلی‌متر بود. پرگنه‌های این قارچ قهوه‌ای تا قهوه‌ای زیتونی و در سطح زیرین تشک پتری قهوه‌ای تیره و روشن و مایل به سیاه بود. ریسه‌ها در سطح محیط کشت و به مقدار بیشتری داخل محیط کشت رشد کرده بود. ریسه‌های هوایی به‌صورت پراکنده تشکیل شده بود. کنیدیوفورها به طور مستقیم از ریسه‌های موجود در سطح محیط کشت تولید شده بود و ساده بود. کنیدیوم‌ها به صورت منفرد و یا زنجیری تشکیل شده بود و شکل منظمی نداشتند و اندازه بسیار متغیر و بدون نوک بود. این گونه به دلیل شکل نا منظم کنیدیوم از سایر گونه‌های این جنس متمایز است. کلامیدوسپور به فراوانی تشکیل شده بود.

در قارچ *Colletotrichum gloeosporioides* ((بیلی و جگر، ۱۹۹۲ (۳))، (ساتن، ۱۹۹۸ (۳۴)) میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پس از گذشت ۱۰ روز ۵۲ میلی متر و رشد نسبتاً سریعی داشت. رنگ پرگنه بسیار متنوع بوده به‌طوری‌که در ابتدا سفید مایل به خاکستری و سپس خاکستری تیره شد. کنیدیوم‌ها یک سلولی، بی رنگ، استوانه‌ای شکل تا بیضوی با دو انتهای گرد و یا در یک انتها باریک بودند. این گونه روی محیط کشت به مقدار فراوان خار تولید کرده که اکثر این خارها دارای چهار دیواره عرضی بودند. این قارچ عامل آنتراکنوز و یکی از شایع‌ترین قارچ‌هایی است که از روی بسیاری از گیاهان زراعی، باغی، سبزیجات، علف‌های هرز و انواع مرکبات گزارش شده است (۹).



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپی قارچ‌های شناسایی شده *S .lanosoniveum* (کریستال هشت وجهی (A)، کنیدیوفور و سرکنیدیومی (D)، کنیدیوم های نیمه کروی تا بیضوی (B))، *P .chrysogenum* (کنیدیوفور منشعب، متولا، استریگما، کنیدیوسپور کروی(B وC))، *N .macrodidyma* (ماکروکنیدی‌ها(F))، *F .oxysporum* (میکروکنیدی، ماکروکنیدی و فیالیدهای نسبتا کوتاه (G وH))، *C .gloeosporioides* (کنیدیوم‌های یک سلولی (K))

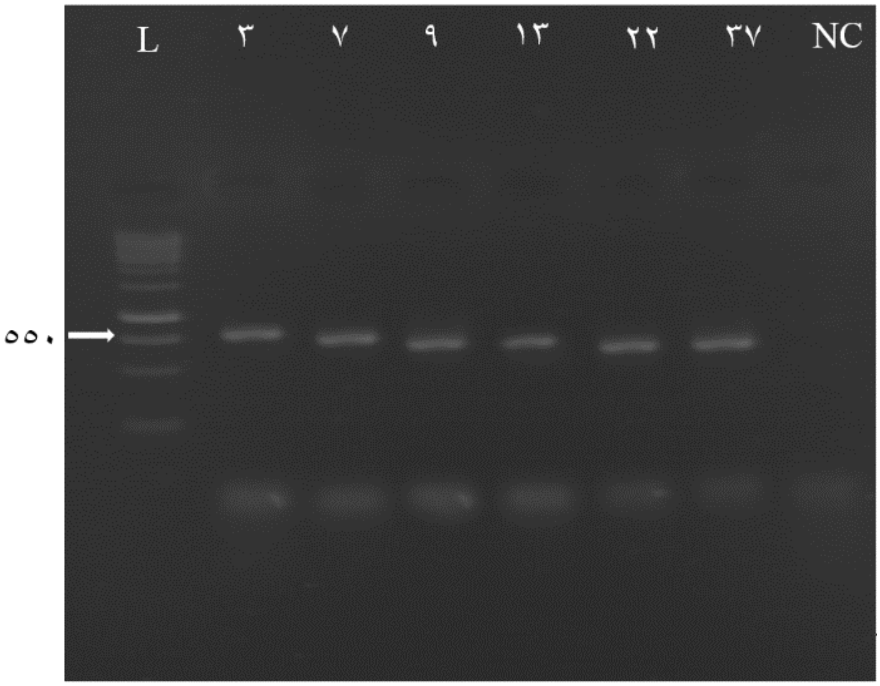
Figure 2- Microscopic images of identified fungi: *S .lanosoniveum* (Octahedral crystal (A), Conidiophores and conidial heads (D), Subglobose to ellipsoidal conidia (E)), *P .chrysogenum* (Conidiophore, Metula, Sterigma, Conidia (B, C)), *N .macrodidyma* (Macroconidia (F), *F .oxysporum* (microconidia, macroconidia, short phialides (G, H)), *C .gloeosporioides* Conidia (K))

در قارچ *Neonectria macrodidyma* (چاوری و همکاران، ۲۰۱۱ (۷)) میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA و دمای ۲۵

درجه سانتی‌گراد پس از گذشت ۱۰ روز، ۲۱ میلی‌متر و بسیار کند رشد بود. پرگنه‌های این قارچ ابتدا زرد روشن تا نارنجی و رشد حلقه‌ای و بعد از گذشت حدود ۱۴ روز مرکز پرگنه قهوه‌ای تا نارنجی تیره شده بود. در سطح زیرین تشک پتری رنگ پرگنه نارنجی تیره تا قهوه‌ای و در انتها زرد رنگ دیده شد. میکروکنیدی‌ها بی‌رنگ، شفاف، بیضوی تا تخم‌مرغی شکل و یک سلولی و به صورت زنجیری دیده شد. ماکروکنیدی‌ها بی‌رنگ، استوانه‌ای مستقیم یا کمی خمیده و دارای یک تا سه دیواره عرضی بود. طبق منابع در دسترس (۹) این گونه برای فلور قارچی ایران جدید بود و همچنین اولین گزارش این گونه قارچی از نماتد سیستی چغندرقند است.

تصاویر میکروسکوپی قارچ‌های فوق در شکل ۲ آمده است.

تکثیر ناحیه ITS1 و ITS4 توسط آغازگرها برای جدایه‌ها باند حدود ۵۵۰ تا ۶۵۰ جفت باز را تولید کرد. همچنین شاهد منفی که تمام اجزای واکنش PCR به جز DNA را داشت هیچ باندی تولید نکرد. نتایج کار در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳- محصول PCR نواحی تکثیر شده مربوط به جدایه‌های قارچی در ژل آگارز دو درصد

Figure 3- PCR product of amplified regions related to fungal isolates in 2% agarose gel

ترادف‌های به دست آمده با دیگر ترادف‌های موجود در بانک ژن با استفاده از ابزار جستجوی BLASTn موجود در پایگاه داده NCBI، مقایسه و نزدیک‌ترین ترادف با هر کدام از ترادف‌های حاصل شناسایی گردید. با استفاده از بلاست، توالی جدایه‌های 10P با جدایه *P. chrysogenum* (JN093270.1) موجود در بانک ژن ۹۹ درصد تشابه و ۹۶ درصد هم‌پوشانی، جدایه‌های 7S با گونه *S. lanosoniveum* (KT878334.1) موجود در بانک ژن ۹۹ درصد تشابه و ۹۸ درصد هم‌پوشانی، جدایه‌های 13F با جدایه *F. oxysporum* (MF992182.1) موجود در بانک ژن ۹۸ درصد تشابه و ۹۸ درصد هم‌پوشانی، جدایه‌های 35A با جدایه *A. chlamydospora* (KY788047.1) موجود در بانک ژن ۹۸ درصد تشابه و ۱۰۰ درصد هم‌پوشانی، جدایه‌های 36N با جدایه *N. macrodidyma* (GQ169024.1) موجود در بانک ژن ۹۸ درصد تشابه و ۹۶ درصد هم‌پوشانی و جدایه‌های 5C با جدایه *C. gloeosporioides* (KU097215.1) موجود در بانک ژن ۹۹ درصد تشابه و ۹۷ درصد هم‌پوشانی داشتند. نتایج به دست آمده در جدول ۲ آورده شده است.

نتایج بررسی نسبی فعالیت آنزیم لیپاز

اطراف پرگنه جدایه‌هایی که آنزیم لیپاز تولید کردند یک رسوب یا هاله بدون رنگ تشکیل شده بود، که این رسوب ناشی از تشکیل نمک کلسیم از لاریک اسید آزاد به‌وسیله آنزیم لیپاز بود که این نشان‌دهنده فعالیت مثبت لیپاز می‌باشد.

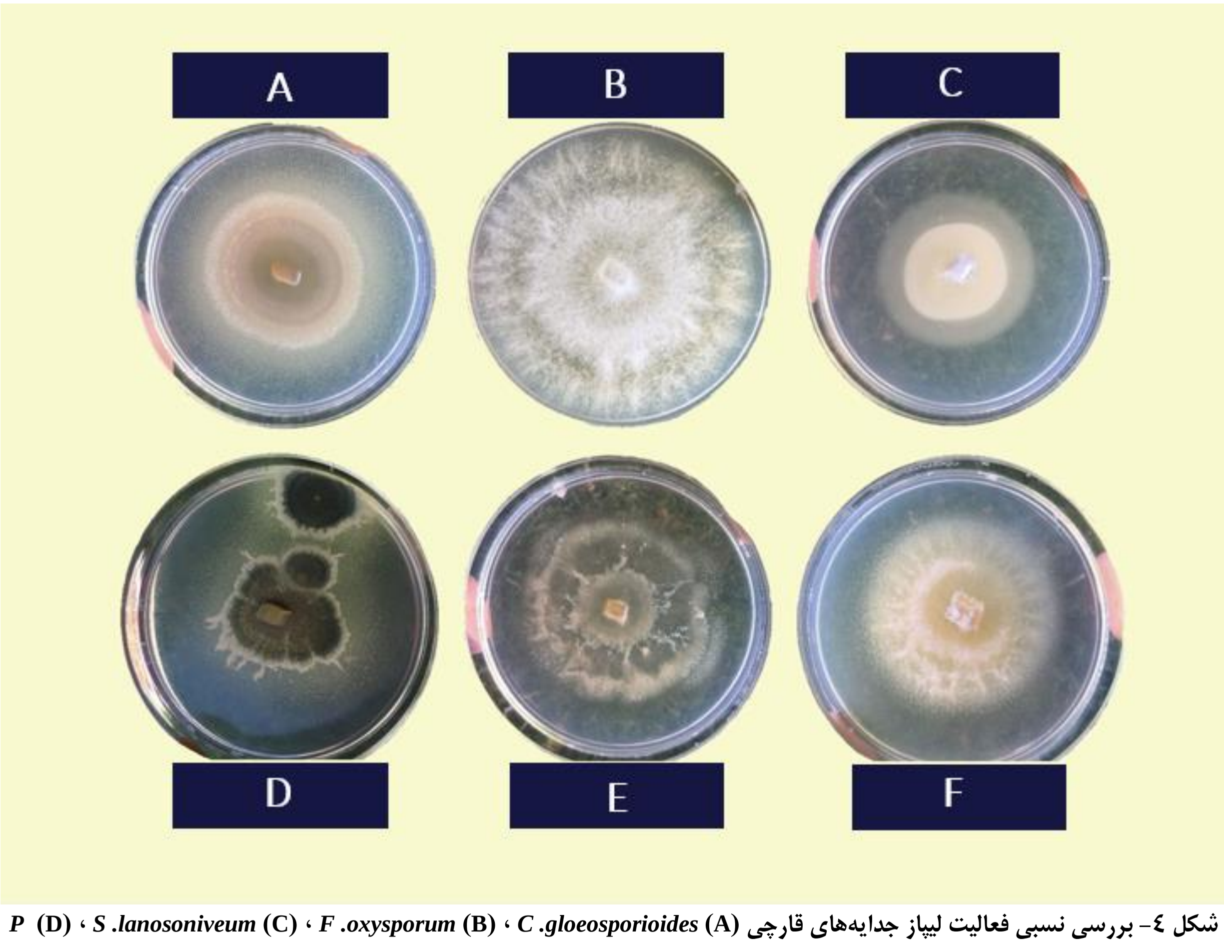
از بین جدایه‌های بررسی شده قارچ *C. gloeosporioides* با داشتن بیشترین میزان قطر هاله، بیشترین میزان رسوب را تشکیل داد که نشان‌دهنده فعالیت آنزیم لیپاز است و برترین جدایه در این آزمون

می‌باشد (جدول ۳). بعـد از آن قـارچ‌هـای *N. macrodidyma* و *P. chrysogenum* بیشترین میزان فعالیت آنـزیم لیپـاز را نشـان دادنـد. قارچ *F. oxysporum* هـیچ رسـوبی نشـان نـداد و کمتـرین میـزان فعالیت آنزیم لیپاز در این قارچ مشاهده شد (شکل ۴).

جدول ۲- نتایج بلاست (BLAST) قارچ‌های شناسایی شده

Table 2- Blast results (BLAST) of identified fungi

Fungi نام	I dent % درصد شباهت	E value ارزش مورد انتظار	Query cover % همپوشانی	Total score نمره دقت	Max score بالاترین نمره	Accession Number شماره دسترسی	Code کد
Penicillium chrysogenum	99	0.0	96	514	514	MG200127.1	10P
Simplicillium lanosoniveum	99	0.0	98	1033	1033	MG200126.1	7S
Fusarium oxysporum	98	0.0	98	793	793	MG200129.1	13F
Alternaria chlamydospora	98	0.0	100	577	577	KY788047.1	35A
Neonectria macrodidyma	98	0.0	96	586	586	GQ169024.1	36N
Colletotrichum gloeosporioides	99	0.0	97	665	665	MG200132.1	5C



شکل ٤- بررسی نسبی فعالیت لیپاز جدایه‌های قارچی (A) *C .gloeosporioides*، (B) *F .oxysporum*، (C) *S .lanosoniveum*، (D) *P .chrysogenum*، (E) *A .chlamydospora*، (F) *N .macrodidyma*

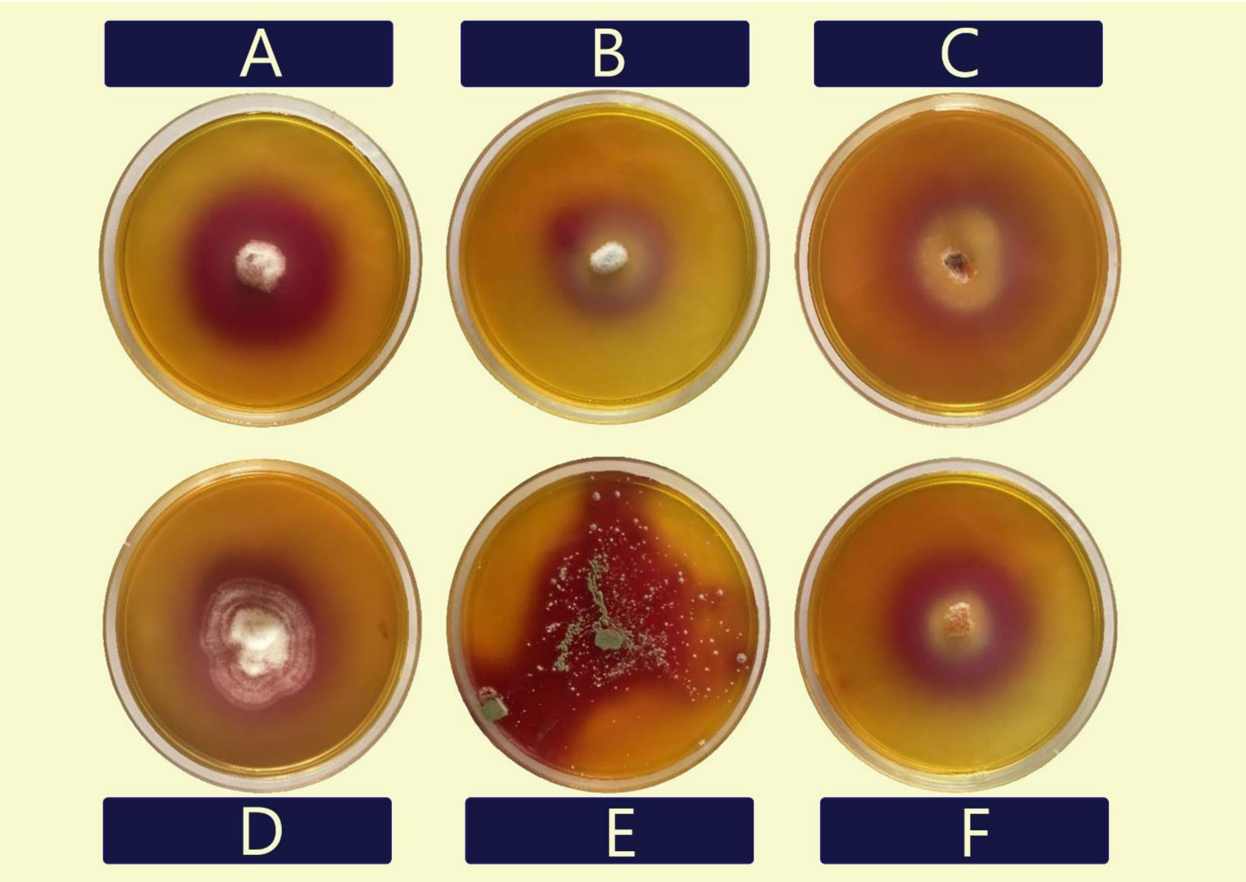
Figure 4- Relative analysis of fungal isolates Lipase activity (A) *C .gloeosporioides*, (B) *F .oxysporum*, (C) *S .lanosoniveum*, (D) *P .chrysogenum*, (E) *A .chlamydospora*, (F) *N .macrodidyma*

نتایج بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز

در این آزمون جدایه‌های قارچی روی محیط کشت‌هـای حـاوی کیتین کلوئیدال کشت داده شدند. در اطراف پرگنه و همین‌طور رنگ محیط کشت جدایه‌هایی که تولید آنـزیم کیتینـاز داشـتند بـه رنـگ

بنفش تغییر رنگ داده بود که این تغییر رنـگ نشـان‌دهنـده فعالیـت مثبت آنزیم کیتیناز در این جدایه‌ها بود.

بررسی نسبی فعالیت کیتیناز (قطر هاله تشکیل شـده) نشـان داد که جدایه *P. chrysogenum* بیشترین و سریع‌ترین تغییر رنـگ بـه بنفش را داشته که نشان‌دهنده بیشترین تولید آنـزیم کیتینـاز توسـط این قارچ بود (جدول ۳). کمترین میزان تولید آنـزیم کیتینـاز توسـط قارچ *C. gloeosporioides* بود که نسبت به سایر جدایه‌ها کمترین و کندترین تغییر رنگ را نشان دادند و از نظـر تولیـد آنـزیم کیتینـاز ضعیف‌ترین جدایه معرفی شد (شکل ۵).



شکل ۵- بررسی نسبی فعالیت کیتیناز جدایه‌های قارچی (A)*F .oxysporum* ، (B)*C .gloeosporioides* ، (C) *N .macrodidyma*، (D) *S .lanosoniveum*، (E) *P .chrysogenum*، (F) *A .chlamydospora*

Figure 5- Relative analysis of fungal isolates chitinase activity (A) *F .oxysporum*, (B) *C .gloeosporioides*, (C) *N .macrodidyma*, (D) *S .lanosoniveum*, (E) *P .chrysogenum*, (F) *A .chlamydospora*

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش، قارچ‌های مختلفی از نماتد سیستی چغندرقند *H. schachtii* جداسازی شد. بیشترین جدایه‌های قارچی بـه ترتیـب بـه شهرستان تربت‌حیدریه و فریمان و کمترین جدایه‌ها به خـواف تعلـق داشـت. بـه‌طـورکلی بیشـترین فراوانـی جدایـه قـارچی بـه جـنس *Fusarium* با ۳۷/۵۲ درصد اختصاص داشت. جداسازی قارچ‌های *S. lanosoniveum*، *P. chrysogenum*، *C. gloeosporioides* برای اولین بار از نماتد سیستی چغندرقنـد گـزارش شـد. در بررسـی نسـبی فعالیت آنزیم لیپاز مشخص شد که قـارچ‌هـای *P. chrysogenum* و *C. gloeosporioides* بیشترین میزان تولید آنزیم لیپاز را داشتند، که برترین جدایه‌ها در این آزمون بودند. بررسـی نسـبی فعالیـت کیتینـاز نشان داد که *P. chrysogenum* بیشترین و سریع‌ترین تغییر رنگ به بنفش را داشته که نشان‌دهنده بیشترین تولید آنزیم کیتیناز توسط این قارچ بـود. کمتـرین میـزان تولیـد آنـزیم کیتینـاز توسـط جدایـه *C. gloeosporioides* بـود کـه نسـبت بـه سـایر جدایـه‌هـا کمتـرین و کندترین تغییر رنگ را نشان داد. قارچ *P. chrysogenum* در هـر دو آزمون انجام‌شده، بهترین نتیجـه را نشـان داد؛ لـذا ایـن قـارچ بـرای بررسی‌های بیشتر در پژوهش‌های بعدی بـا رعایـت احتیـاط و نکـات لازم توصیه می‌شوند.

جدول ۳- اندازه هاله‌های ایجاد شده توسط جدایه‌های قارچی
Table 3- The size of the halos created by the fungal isolates

نام قارچ **Fungi**	کد جدایه **Isolate code**	قطر هاله بنفش از مرکز تشک پتری در تست کیتیناز (cm) **The diameter of the purple halo from the center of the Petri mattress in the chitinase test (cm)**	اندازه رسوب از حاشیه رشد قارچ در تست لیپاز (cm) **Sediment size from the fungal growth margin in lipase testing (cm)**
Simplicillium lanosoniveum	7S	4	1
Penicillium chrysogenum	10P	10	1.3
Fusarium oxysporum	13F	6	0.5
Alternaria chlamydospora	35A	6	0.8
Neonectria macrodidyma	36N	7	1
Colletotrichum gloeosporioides	5C	3	2
شاهد (محیط کشت بدون قارچ)	CM_{Lip} & CM_{Chit}	0	0

CM: Control Sample

منابع

1- Agrawal T., and Kotasthane A.S. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. SpringerPlus 1(1): 73.
2- Arbabi M. 2014. Sugar Beet Handbook.
3- Bailey J.A. 1992. Colletotrichum; biology, pathology and control.
4- Benítez T., Rincón A.M., Limón M.C., and Codon A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology **7**(4): 249-260.
5- Bird A.F., and McClure M. 1976. The tylenchid (Nematoda) egg shell: structure, composition and permeability. Parasitology 72(1): 19-28.
6- Brown R., and Kerry B. 1987. Principles and practice of nematode control in crops, Academic Press.
7- Chaverri P., Salgado C., Hirooka Y., Rossman A., and Samuels G. 2011. Delimitation of Neonectria and Cylindrocarpon (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with Cylindrocarpon-like anamorphs. Studies in mycology 68: 57-78.
8- El-Sayed S., and Mahdy M. 2015. Effect of chitosan on root-knot nematode, Meloidogyne javanica on tomato plants. International Journal of ChemTech Research **7**(4): 1985-1992.
9- Ershad J. 2009. Iranian Mushrooms.
10- Evans K., and Rowe J. 1998. Distribution and economic importance. The cyst nematodes, Springer: 1-30.
11- Fenwick D. 1940. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. Journal of Helminthology 18(4): 155-172.
12- Frisvad J.C., and Samson R.A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. Studies in Mycology 49(1): 1-174.
13- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., and Lorito M. 2004. *Trichoderma* species—

opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature reviews Microbiology 2(1): 43.
14- Hoseney R.C. 1994. Principles of cereal science and technology, American Association of Cereal Chemists (AACC).
15- Howell C. 2003. Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant disease 87(1): 4-10.
16- Jackson A., Walters D., and Marshall G. 1994. Evaluation of *Penicillium chrysogenum* and its antifungal extracts as potential biological control agents against *Botrytis fabae* on faba beans. Mycological_Research 98(10): 1117-1126.
17- Jafarpoor B.S., and Jahanbakhsh V.M. 2012. Laboratory Methods in Plant Pathology.
18- Jatala P. 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. Annual review of phytopathology 24(1): 453-489.
19- Kavari M., Rouhani H., and Mahdikhani Moghaddam E. 2014. Investigating the relationship between the enzyme's ability of several isolates from *Trichoderma* fungi with biocontrol ability of this fungus against tomato root knot nematodes. Master's Thesis.
20- Kerry B., and Crump D. 1977. Observations on fungal parasites of females and eggs of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae*, and other cyst nematodes. Nematologica 23(2): 193-201.
21- Khezri Nejad N., Gusta E., and Niknam G. 2006. Introducing fungi with sugar beet cyst nematode from western Azarbaijan fields (1). Rostaniha,7.
22- Khezri Nejad N., Gusta E., and Niknam G. 2009. Introducing fungi with sugar beet cyst nematode from western Azarbaijan fields (2). Journal of Sustainable Agricultural Science, Vol. 19/1.
23- Leslie J., and Summerell B. 2006. The Fusarium Laboratory Manual Blackwell Publishing. Ames, Iowa.
24- Mahdikhani Moghadam E., Rouhani H., and Rastgar Fallahi M. 2009. Biological control of *Heterodera schachtii* sugar beet nematode by *Trichoderma* fungus in laboratory and greenhouse._Journal of Water and Soil Science, Agricultural and Natural Resources Sciences- Isfahan University of Technology 13: 301-312.
25- Mireke K., Abdollahi Dehdari K., and Ashcbus. 2013. The reaction of eight tomato cultivars to the rootstock nematode producing Meloidogyne javanica in greenhouse conditions. Iranian Plant Protection Sciences.
26- Mokaram Hesar A. 2010. "Identification of heterodera species in sugar beet fields and *Meloidogyne* species in tomato fields of Khorasan Razavi province using morphological and molecular techniques." Master's thesis.
27- Mouchacca J. 1973. Deux Alternatria des sols arides d'Égypte: *A. Chlamydosporum* sp. nov. et A. Phragmospora Van Emden. Mycopathologia 50(3): 217-225.
28- Nigh E.A., Thomason I.J., and Van Gundy S. 1980. Identification and distribution of fungal parasites of *Heterodera schachtii* eggs in California. Phytopathology 70(9): 885-889.
29- Nonaka K., Kaifuchi S., Ōmura S., and Masuma R. 2013. Five new Simplicillium species (Cordycipitaceae) from soils in Tokyo, Japan. Mycoscience 54(1): 42-53.
30- Pitt J.I. 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*.
31- Sasser J.N. 1989. Plant-parasitic nematodes: the farmer's hidden enemy. Plant-parasitic nematodes: the farmer's hidden enemy.
32- Statistics A.S., Publications 2014. Ministry of Agriculture.
33- Sunitha V., Nirmala Devi D., and Srinivas C. 2013. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. World Journal of Agricultural Sciences 9(1): 1-9.
34- Sutton B.C. 1980. The Coelomycetes, Fungi Imperfecti with Pycnidia. Acervuli and stromata: 470-472.
35- Thiagarajan V., Revathi R., Aparanjini K., Sivamani P., Girilal M., Priya C., and Kalaichelvan P. 2011. Extracellular chitinase production by *Streptomyces* sp. PTK19 in submerged fermentation and its lytic activity on *Fusarium oxysporum* PTK2 cell wall. Int. J. Curr. Sci. 1: 30-44.
36- Whitehead A. 1986. Problems in the integrated control of potato cyst-nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*, and their solution. Aspects of applied Biology.

Journal of Plant Protection
Vol. 34, No. 1, Spring 2020, P. 1-13

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹، ص. ۱۳-۱

Relative Production of Lipase and Chitinase Enzymes Isolated from Cyst Nematode in Sugar Beet *in Vitro*

A. Soleimani[1]- E. Mahdikhani-Moghadam[2]*- H. Rouhani[3]
Received: 10–03-2019
Accepted: 28–01-2020

Introduction: Sugar beet is adaptable to be cultivated in different weather conditions and regions. In 2015, the overall area for sugar beet cultivation was estimated about 105,000 hectares which 19000 of this was in Khorasan Razavi province. Sugar beet is considered as a valuable agricultural crop both for economy and employment. Nevertheless, producing this crop faces many challenges including the high number of pests. One of these pathogenic factors is the nematodes. Among plant-parasitic nematodes cyst nematodes are a large group with economic importance in different countries. These nematodes cause much damage to agricultural crops. Among the different cyst nematode genera Globodera and Heterodera have species which are important due to economic damage.

Materials and Methods: During the year of 2016, 22 samples of soil and roots of sugar beet in cyst nematodes contaminated field in Khorasan Razavi were gathered. Cyst nematodes were extracted by the use of a small clip and a binocular and put in petri dish with some water. White materials were also taken from the root by a delicate needle and put in sterile distilled water after washing. Separating and purifying fungi were done in 3 parts: separating fungi from cysts and materials, separating fungi from eggs and larvae nematode, and making single spore fungi and pure culture. The cysts and separated materials were washed by distilled water for several times and antisepticised for 1, 2 or 3 minutes in 10% Sodium Hypochlorite, and 10% and 20% Ethyl alcohol. Cysts and materials were washed again with sterile distilled water and sterile sifter was used. The cysts and materials in petri dish containing PCA, PDA, CMA and MEA culture mediums were separately taken and cultured by a needle under laminar. Four cysts were placed at the 4 sides of each 8cm petri dish containing the above mentioned culture mediums. 16 brown cysts from each soil sample were cultured. Two petri dishes from each sample were kept and checked consistently in two hot and cold temperatures in incubator with 20-25 and incubator with 8-10. After 7-14 days the grown fungi were taken to a new culture medium of PDA for a better development and in later stages they were purified on WA culture medium by single spore or hyphal tip methods. Purified fungi were kept in test tubes containing PCA food environment and 4 temperature and also on sand for later studies. Cyst shells were destructed by cyst crusher (homogenizer) and their eggs and mash were released. Released eggs from cysts were formed into suspension in sterile water. 0.5-1 ml of suspension of eggs and larvae were taken by sterile micropipette and diffused on petri dish containing water agar culture medium. These culture mediums were kept and checked regularly in dark in the incubator with 20-25 °C. Grown fungi from these eggs and larvae were taken to a new culture medium and purified by single spore and hyphal tip methods. WA culture medium was used for single spurring and purifying fungi. PCR based methods: morphological and molecular identification, were used to identify the fungi isolates. Mycelium fungi growth phases, fungi DNA extraction, PCR reaction and electrophoresis were done to identify molecular fungi. Lipase and chitinase assays were performed on the isolates.

Results and Discussion: For Lipase test, each fungal isolate was cultured on peptone agar media and after 7 days isolates were examined. Around the colony of the isolates produced by the lipase enzyme formed a precipitate or a colorless aura, which is due to the formation of calcium salts from free lauric acid by the lipase enzyme, which indicates the positive activity of lipase. Among the isolates, *Colletotrichum gloeosporioides* had the highest sediment content, indicating the activity of lipase enzyme and the highest isolate in this test. After that, *Neonectria macrodidyma* and *Penicillium chrysogenum* showed the highest activity of lipase enzyme activity. *Fusarium oxysporum* showed no sediment and the lowest level of lipase enzyme activity was observed in this fungus. For chitinase test, isolates were cultured on colitic kitein medium. Around the colony and also the color of the culture medium, the chitinase-producing isolates changed the violet color, which indicates the positive activity of the chitinase enzyme in these isolates. Relative analysis of chitinase activity showed that the isolate of *P. chrysogenum* had the largest and fastest change in color to violet, indicating the highest production

1, 2 and 3- Ph.D. Student of Plant Pathology and Professors, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mahdikhani-e@um.ac.ir)

of chitinase enzyme by this fungus. The lowest chitinase production was by *C. gloeosporioides*, which showed the slightest and slowest changes in color compared with other isolates and the weakest isolate was introduced for the production of chitinase enzyme.

Conclusion: In this research, different fungi were isolated from sugar beet cystc. Most fungal isolates belonged to Torbat-e-Haidiriyah and Fariman, and the least isolates belonged to Khaf. The highest frequency of *Fusarium* isolates was found to be 37.35%. Isolation of *Simplicillium lanosoniveum* fungi, *P. chrysogenum*, *C. gloeosporioides* was the first reported cyst nematode in sugar beet. In the relative analysis of lipase activity, it was found that *P. chrysogenum* and *C. gloeosporioides* fungi exhibited the highest amount of lipase production, which was the highest marker in this test. Relative analysis of chitinase activity showed that *P. chrysogenum* had the largest and fastest color change to purple, indicating the highest production of chitinase enzyme by this fungus. The lowest chitinase production was obtained by isolate *C. gloeosporioides*, which showed the slightest and slowest changes in color compared with other isolates. The fungus *P. chrysogenum* showed the best results in both tests, this fungus is, therefore, recommended for further research with the observation of the necessary points.

Keywords: Chitinase, Cyst nematode, Fungi, Lipase, Sugar beet